

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ «КИЇВСЬКИЙ
ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

ЗАІД АЛІ АЗІЗ



УДК 631.461:631.531.027.04(043.3)

**ВПЛИВ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ НАСІННЯ НА МІКРОБІОТУ
РИЗОСФЕРИ ТА ЕКСКРЕТОРНУ АКТИВНІСТЬ ПРОРОСТКІВ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ– 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Науково-дослідному інституті біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Божков Анатолій Іванович,

Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

МОН України, директор, завідувач кафедри молекулярної біології та біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Кричківська Лідія Василівна,

Національний технічний університет

«Харківський політехнічний інститут» МОН України,

професор кафедри органічного синтезу та нанотехнологій

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Поєдинок Наталія Леонідівна,

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки

НАН України»,

старший науковий співробітник

Захист відбудеться « 20 » листопада 2020 року о 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258.

З дисертацією можна ознайомитись у Науково-технічній бібліотеці ім. Г. І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37.

Автореферат розісланий

« 19 » жовтня 2020 року

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

Д 26.002.28, д.т.н., проф.

Н. Б. Голуб

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Отримання біологічно активних сполук є однією з найважливіших задач сучасної біотехнології. Вони використовуються в фармації, сільському господарстві, при розробці біосенсорів, як регулятори росту (Raju P., 2016; Prasad R. et al., 2017; Bhatia S., 2018; Azeez Z. A. et al., 2020; Bozhkov A. I. et al., 2020). Найчастіше в якості біологічно активних сполук використовують різноманітні метаболіти тваринних, рослинних та бактеріальних клітин (Solecka J. et al., 2012; Hardoim P. R., 2018; Thirumurugan D. et al., 2018). Однак, отримання клітинних метаболітів вимагає виконання ряду складних та дорогих процедур: руйнування клітин, екстракція, очищення, ідентифікація та стабілізація цільового продукту. Поряд з цим в процесі життєдіяльності біологічні системи екскретують цілий ряд екзометаболітів в середовище (Jones W. P. et al., 2012; Pinu F. et al., 2017). Найбільшою мірою екскреторний апарат розвинений у вищих рослин, зокрема, екскреторний апарат кореневої системи. Показано, що корінь виділяє в середовище від 30 до 60 % органічних сполук, що утворюються в процесі фотосинтезу (Hernández M. et al., 2015; Canarini A. et al., 2019). Іншою найважливішою особливістю екскреторної системи коренів є наявність видової специфічності екзометаболітів, що екскретуються. Вперше на це звернув увагу Hans Molisch у 1937 році, описавши явище «алелопатія» (Molisch H., 1937). Дослідженню особливостей механізмів екскреторної активності кореневої системи було приділено велику увагу. Суттєвий внесок в цей науковий напрям внесли українські вчені, зокрема, школа Гродзинського М. Д. (Гродзинский Д. М., 1983). Було показано, що до складу корневих екзометаболітів (КЕМ) входять білки, пептиди, вільні амінокислоти, цукри, фенольні та ліпідні сполуки, вітаміни та рослинні гормони (Vranova V. et al., 2013; Olanrewaju O. S. et al., 2019; Madende M. et al., 2020). Склад екзометаболітів залежить від видового складу рослин, умов та стадії розвитку рослин (Naik P. M. et al., 2016; Kuznetsova Y. A. et al., 2018b; Labarrere B. et al., 2019). Виходячи з цього, при культивуванні рослин у водній культурі можна отримати різноманітні екзометаболіти, при цьому немає необхідності в руйнуванні та екстракції екзометаболітів. Незважаючи на ці переваги, поки відсутні біотехнології отримання та використання корневих екзометаболітів. Це можна пояснити кількома причинами: залишаються мало дослідженими механізми регуляції екскреторної активності, зокрема, їх особливості у рослин з «закритою» (пшениця) та «відкритою» (горох) кореневою меристемою; вплив мікробіоти на екскреторну активність та наявність супутніх мікроорганізмів на насінні рослин. Як відомо, мікробіота дуже впливає як на систему екскреції, так і на склад корневих екзометаболітів, які одержують. Слід зазначити, що серед супутніх мікроорганізмів можуть бути патогенні та умовно-патогенні для людини види мікроорганізмів. У зв'язку з цим, виникає необхідність в дослідженні мікробіоти кореневої ризосфери та епіфітних мікроорганізмів у представників з «закритим» типом меристеми, зокрема, у пшениці та у представників з «відкритим» типом меристеми, представником яких є горох. Для видалення епіфітних мікроорганізмів використовують різні способи передпосівної обробки насіння.

У зв'язку з цим, були досліджені різні способи передпосівної обробки насіння пшениці та гороху, які можуть забезпечувати видалення епіфітних мікроорганізмів та впливати на особливості екскреції корневих екзометаболітів проростків на початкових етапах росту для отримання біологічно активних сполук.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відділі клітинної біології та біотехнології Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна відповідно до НДР «Розробка концепції «динамічних функціональних мереж» на рослинних і тваринних моделях», державний реєстраційний номер №0115U000485.

Мета і завдання дослідження. Дослідити вплив передпосівної обробки насіння на епіфітну мікробіоту, якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху і їх біологічну активність.

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Визначити вплив трьох способів передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на схожість та інтенсивність росту проростків пшениці та гороху.

2. Дослідити вплив передпосівної обробки насіння на епіфітний склад мікроорганізмів насіння пшениці та гороху.

3. Проаналізувати вплив бактерій роду *Bacillus* на ріст проростків пшениці та гороху.

4. Отримати водневі кореневі екзометаболіти проростків пшениці та гороху з 1 по 3 добу їх росту й оцінити вплив трьох способів передпосівної обробки насіння пшениці на якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів

5. Дослідити біологічну активність корневих екзометаболітів пшениці на інтенсивність росту мікроорганізмів з метою їх використання в якості поживного середовища, в якості стимуляторів росту проростків пшениці та гороху в водній культурі і як стимуляторів регенерації печінки у експериментальних тварин.

6. Визначити кількість прикордонних клітин у 1-добових проростків пшениці та гороху.

7. Проаналізувати вплив перекисного внесення корневих екзометаболітів пшениці та гороху на інтенсивність росту проростків пшениці та гороху.

Об'єкт дослідження –коренева екскреція проростків насіння пшениці (*Triticum aestivum*) та насіння гороху(*Pisum sativum*) з 1 по 3 добу росту у водневій культурі та епіфітна мікрофлора насіння пшениці та гороху;

Предмет дослідження – показники кореневої екскреції проростків насіння пшениці та гороху (вміст загального білка, вуглеводів та вільних амінокислот) та вплив передпосівної обробки насіння на показники кореневої екскреції та на склад епіфітної мікрофлори насіння після різних способів передпосівної обробки.

Методи дослідження. Проточне культивування проростків пшениці та гороху у водній культурі, препаративні (виділення прикордонних клітин, збір водневих корневих екзометаболітів), спектрофотометричні (визначення вмісту загального білка, вуглеводів, вільних амінокислот, антиоксидантної й антирадикальної активності корневих екзометаболітів), мікроскопічні методи (визначення морфології мікроорганізмів, визначення кількості прикордонних клітин), молекулярні методи (виділення ДНК мікроорганізмів, проведення полімеразної ланцюгової реакції, електрофорез ДНК, секвенування ДНК), методи культивування

бактерій (на універсальних поживних рідких та твердих середовищах, на середовищах, виготовлених з корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху), радіоактивні методи (визначення швидкості синтезу ДНК і РНК), методи обробки даних (визначення площі колоній бактерій за допомогою програми Axio vision 4.6.3 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH), використання методу непараметричної статистики (критерій Манні – Уїтні) з використанням пакету програм «Statistika V.6»).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що передпосівна обробка насіння пшениці та гороху (перманганатом калію, етиловим спиртом, гіпохлоритом натрію) приводила до стимуляції інтенсивності росту проростків (гормезісний ефект), що більшою мірою проявлялося для насіння гороху.

Вперше показано, що основна кількість корневих екзометаболітів пшениці – це вуглеводи (до 50 – 67 % від загальної кількості), тоді як у гороху 80 – 85 % екзометаболітів становили білки. Показано, що інтенсивність екскреції корневих екзометаболітів (КЕМ) у пшениці («закритий» тип меристеми) майже лінійно збільшувалася з 1 по 3 добу, тоді як у гороху («відкритий» тип меристеми) вона була вищою та залишалася незмінною з 1 по 3 добу росту. Кількість корневих екзометаболітів пшениці на 3 добу росту становила 5,9 мкг / 100 зерен, а КЕМ гороху – 7,1 мкг / 100 зерен.

Показано, що динаміка екскреторної активності для коренів з «закритим» і «відкритим» типом меристеми була різною, як і кількість прикордонних клітин коренів. Якщо в ризосфері 1-добових проростків пшениці було виявлено близько 100 прикордонної клітин на 1 корінь, то у гороху – понад 1000 клітин на 1 корінь.

Вперше показано, що передпосівна обробка насіння пшениці (1 та 2 способами) збільшувала кількість метаболітів, які екскретуються в середовище, на 25 % та 20 % відповідно, а передпосівна обробка насіння гороху (3-м способом) – на 42 % у порівнянні з 1 добою росту, що може збільшувати вихід цільового продукту.

Вперше показано, що склад епіфітних мікроорганізмів насіння пшениці (мікроорганізми, які неможна видалити промиванням насіння проточною водою) представлено двома видами бактерій (*Pantoea agglomerans* strain C410P1, *Pseudomonas fluorescens* strain SBW25), а гороху – чотирма (*Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006, *Staphylococcus pasteurii* strain SMJ3), при цьому два з них є патогенними видами. Передпосівна обробка насіння пшениці (70 % етиловим спиртом C_2H_5OH , 5 % гіпохлоритом натрію $NaOCl$) інактивувала епіфітні мікроорганізми, а інактивацію епіфітних мікроорганізмів гороху забезпечує використання двох видів послідовної обробки насіння (0,05 % розчином перманганатом калію і 70 % етиловим спиртом C_2H_5OH , 5 % гіпохлоритом натрію $NaOCl$), що необхідно при отриманні корневих екзометаболітів.

Вперше показано, що КЕМ пшениці мали антиоксидантну, антирадикальну активність та прискорювали пролиферативну активність клітин печінки після часткової гепатектомії у щурів. Перехресне внесення корневих екзометаболітів до проростків пшениці та гороху мало стимулюючий ефект на ріст проростків. Показано, що КЕМ проростків пшениці та гороху можна використовувати в якості поживних середовищ для росту різних видів мікроорганізмів.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено способи передпосівної обробки насіння для пшениці і гороху, які забезпечують видалення епіфітних мікроорганізмів. Ці способи передпосівної обробки насіння прискорюють інтенсивність росту проростків і збільшують екскреторну активність, що дозволяє їх використовувати в корневих технологіях при отриманні біологічно активних сполук. Ефект стимуляції росту проростків пшениці і гороху при перехресному внесенні підтверджує гіпотезу авторегуляції в системі «корінь ↔ мікрооточення» і може бути використано в корневих технологіях. Поліфункціональність біологічної дії корневих екзометаболітів показана на мікроорганізмах, вищих рослинах і тваринах, яка може знайти застосування на практиці.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці практичних робіт з дисциплін «Загальна біотехнологія», «Загальна мікробіологія і вірусологія» для студентів біологічного факультету кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні вищої освіти.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних законів з відповідними законами України. Біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 9 від 17 жовтня 2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено аналіз наукових літературних першоджерел за темою дисертації, виконані експериментальні дослідження, проведено статистичні розрахунки, написано та оформлено розділи дисертації, переведено власні публікації англійською мовою. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д.б.н., проф., директором НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Божковим А. І. Експерименти щодо вивчення епіфітних мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та гороху виконано спільно з центром Wahj Al DNA в Багдаді (Ірак), визначення антирадикальної та антиоксидантної активності корневих екзометаболітів проростів пшениці виконано спільно з працівниками відділу клітинної біології та біотехнології НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Апробація результатів дослідження. Основні результати дисертації були представлені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів: XV Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances» (Київ, 2017); VI науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 120-річчю НУБіП України «Біотехнологія: Звершення та Надії» (Київ, 2017); XIV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів, присвяченій

185 річниці від дня народження Б. Дибовського «Молодь і поступ біології» (Львів, 2018); XIII науковій конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня заснування Національної академії аграрних наук України «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (Чернігів, 2018); V Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Вінниця, 2018); науково-практичній конференції «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського» (Харків, 2020).

Публікації. За темою дисертаційної роботи було опубліковано 11 наукових праць, з яких 5 статей (1 – в науковому фаховому виданні України, що входить до міжнародної наукометричної бази Web of Science; 2 – в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS; 2 – в зарубіжних спеціалізованих виданнях) та 6 тез доповідей в збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 168 сторінки, з них основного тексту 118 сторінок. Робота ілюстрована 38 рисунками та 11 таблицями. Список використаних джерел містить 277 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано вибір теми дослідження. Сформульовано мету, завдання та методи дослідження. Визначено методи, наукову новизну та практичне значення. Надано відомості щодо наукових публікацій та вказано особистий внесок здобувача, надано інформацію щодо апробації результатів дисертації.

В **огляді літератури** розглянуто сучасну наукову літературу щодо механізмів кореневої екскреції, наведено склад корневих екзометаболітів проростків рослин, проаналізовано дані наукової літератури щодо впливу різних чинників на кореневу екскрецію рослин. На підставі аналізу наукової літератури узагальнено відомості щодо складу різосфери кореня та взаємовпливу мікроорганізмів різосфери на екскреторну активність кореня.

Матеріали та методи дослідження. У роботі використовували насіння гороху (*Pisum sativum*) та насіння пшениці (*Triticum aestivum*) врожаю 2018 року. Насіння пшениці та гороху обробляли трьома способами. *Контрольний варіант:* зерна пшениці та гороху 3 рази промивали проточною водою і 3 рази дистильованою стерильною водою.

Перший спосіб передпосівної обробки: зерна пшениці та гороху після промивання, як описано в контрольному варіанті замочували в 0,05 % розчині перманганату калію на 5 хвилин, потім багаторазово (3-4 рази) промивали дистильованою стерильною водою.

Другий спосіб передпосівної обробки: після контрольного промивання зерна пшениці та гороху замочували на 30 секунд у 70 % етиловому спирті (C_2H_5OH), потім промивали стерильною дистильованою водою і потім замочували на 30 вилин в 5 % гіпохлорит натрію ($NaOCl$). Після цього зерна промивали стерильною дистильованою водою.

Третій спосіб передпосівної обробки насіння відрізнявся від другого способу часом замочування зерен в етиловому спирті та гіпохлорит натрію. Тобто, після контрольного промивання зерна пшениці та гороху замочували на 5 хвилин у 70 % етиловому спирті (C_2H_5OH), потім промивали стерильною дистильованою водою і потім замочували на 40 хвилин у 5 % гіпохлорит натрію ($NaOCl$). Після цього зерна промивали стерильною дистильованою водою.

Після всіх варіантів передпосівної обробки насіння зерна пшениці та гороху окремо замочували у стерильній дистильованій воді і залишали на 24 години при 26 °C при постійному освітленні. Через 24 години зернівки, які проклінулися, з кожного варіанту обробки розкладали в чашках Петрі по 25 зерен для гороху та по 50 зерен для пшениці. У кожену чашку Петрі додавали по 10 мл стерильної дистильованої води для гороху та по 7 мл для пшениці. Зерна пшениці та гороху культивували в проточному режимі протягом 3 діб при цілодобовому освітленні 4 клк та при температурі 26 °C.

Для визначення схожості насіння пшениці та гороху на 1-у, 2-у та 3-ю добу росту рахували кількість зерен, які не проросли. Визначали довжину коренів з 1-ї по 3-ю добу росту.

Для характеристики 1-х, 2-х та 3-х добових кореневих екзометаболітів (КЕМ) визначали вміст загального білка (Lowry O. B., 1957), вільних амінокислот як описано в (Bozhkov A. I. et al., 2013), та загальних вуглеводів нінгідриновим методом (Masuko T. et al., 2005).

Визначення епіфітних мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та гороху проводили після контрольного варіанту передпосівної обробки, після 1-го та 2-го способів. Для цього зразки мікроорганізмів, які брали з поверхні насіння після обробки культивували на універсальному рідкому поживному середовищі МПА, після чого отримували чисті культури мікроорганізмів. Аналізували морфологію клітин мікроорганізмів за допомогою мікроскопу. Для ідентифікації грамнегативних бактерій визначали біохімічні показники клітин за допомогою API 20E-тесту. Для ідентифікації бактерій проводили молекулярні тести, а саме виділяли ДНК з ізолятів бактерій за допомогою набору G-spin DNA extraction, intron biotechnology, cat. no 17045 / (Корея). Після екстракції ДНК зразки аналізували за допомогою гель-електрофорезу (Winn W. et al., 2006). Для збільшення кількості копій, досліджуваних ДНК проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з використанням набору Maxime PCR Premix (in-Taq) 25025- Intron / Korea. В якості праймерів використовували The specific primer 16S RNA of gene (IDT компанії - Integrated DNA Technologies, Канада)) в центрі Wahj Al DNA Багдад / Ірак (Srinivasan R., 2015). Для визначення розміру отриманих ДНК після ПЛР проводили гель електрофорез зразків ДНК у 2 % агарозному гелі з використанням набору KAPA Universal DNA Ladder (cat # KK6302) при 5 вольт / см², 1x буфера TBE протягом 1:30 годин. Секвенування отриманих фрагментів ДНК проводили в дослідницькому центрі (MacroGen, Корея). Генетичну відповідність визначали за програмою Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), яка дає відповідну кореляцію цих генів з іншими генами відомих штамів мікроорганізмів та доступний в Національному центрі біотехнологічної інформації (NCBI) (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov>).

В роботі оцінювали біологічну активність КЕМ пшениці та гороху. Для цього визначали антиоксидантну активність КЕМ пшениці, яку оцінювали за їхньою здатністю зменшувати накопичення продуктів активних до тіобарбітурової кислоти (ТБА) в суспензії ліпопротеїнів жовтка, як описано Klebanov G. I. et al. (Klebanov G. I. et al., 1998). Експериментальні дослідження щодо впливу КЕМ пшениці на швидкість синтезу ДНК і РНК в клітинах печінки щурів після часткової гепатектомії були виконані на 3 місячних (міс.) щурах-самцях лінії *Wistar*. Щурів вирощували й утримували у віварії НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Дослідження проводили відповідно до «Спільних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2011р.), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р). Зупинку експериментальних процедур здійснювали зануренням тварин в ефірний наркоз з подальшим отриманням крові та виділенням у них клітин.

Використовували КЕМ пшениці та гороху в якості поживного середовища для росту різних видів бактерій: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus cereus*. Динаміку росту культур мікроорганізмів оцінювали за площею колоній за допомогою комп'ютерної програми Axio vision.

Визначали вплив рідких культур *Bacillus cereus* та *Bacillus popilliae* на проростання зерен та на ріст проростків пшениці та гороху. Для цього вносили 1 добові рідкі культури мікроорганізмів в обсязі 10 мл та 7 мл в чашки Петрі з зернами гороху та пшениці відповідно. За аналогічною схемою вивчали вплив кореневих екзометаболітів гороху на ріст пшениці та екзометаболітів пшениці на ріст коренів гороху.

Всі експерименти були проведені в 3 біологічних та 3 аналітичних повторностях. Для кожного показника були розраховані середні значення та стандартна помилка середнього. Відмінності між показниками аналізували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні (Mann and Whitney, 1947). Відмінності вважалися статистично значущими при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на схожість та інтенсивність росту проростків у водної культури. Відомо, що на початкових етапах проростання спостерігається інтенсивний ріст коренів як у пшениці, так і у гороху. Так, за 1 добу довжина кореня пшениці сягала $0,76 \pm 0,03$ см, а гороху $0,58 \pm 0,03$ см, а вже до 3 доби, відповідно, 2,78 см і 1,78 см (рис. 1А, В). Необхідно відзначити, що інтенсивність росту проростків з 1 по 3 добу була нелінійною як для пшениці, так і для гороху, з максимальною питомою швидкістю росту на 2 добу росту (1,13 см / добу для пшениці і 0,79 см / добу для гороху) (рис. 1Б, Г).

Передпосівна обробка насіння пшениці 1-м способом не впливала на інтенсивність росту коренів (рис. 1А). Однак, питома швидкість росту перевищувала контроль на 2 добу росту, тоді як на 3 добу відставала від контролю (рис. 1Б). Отже, передпосівна обробка насіння пшениці перманганатом натрію збільшувала

варіабельність відносної швидкості росту коренів у порівнянні з контрольним варіантом. У тому випадку, якщо насіння пшениці обробляли 2-м способом (30 сек. етиловим спиртом і 30 хв. гіпохлоритом натрію), то вони перевищували контрольний варіант по довжині кореня на 25 % на 3 добу (рис. 2А, В).

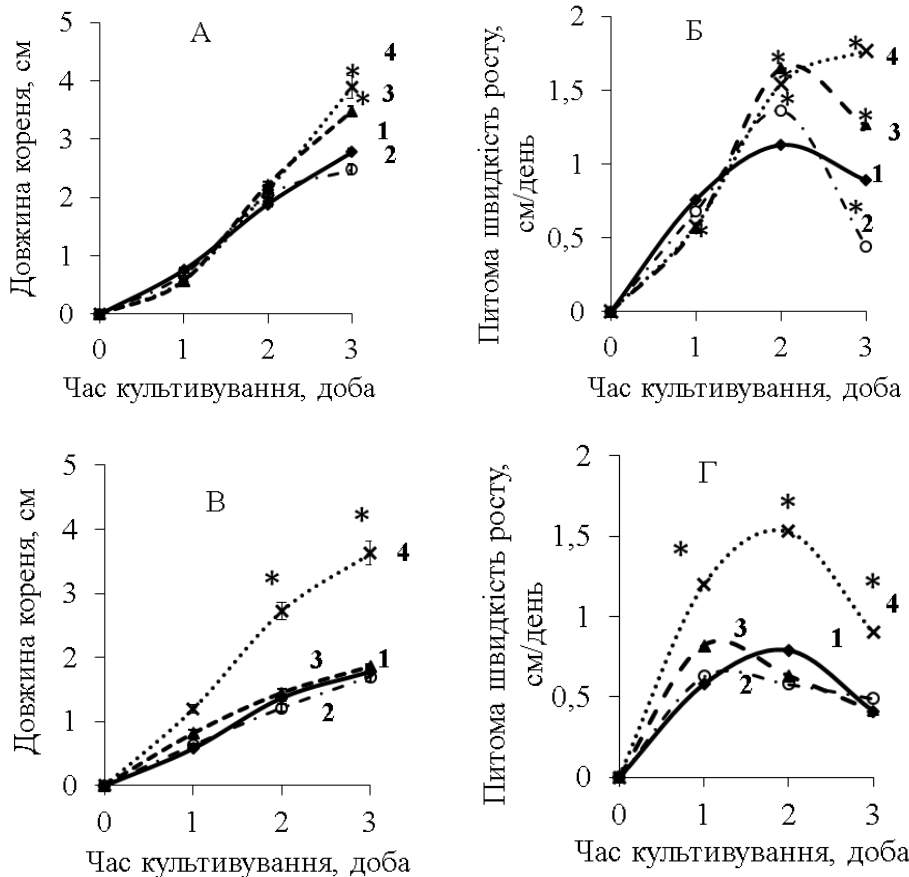


Рис. 1 Довжина коренів проростків пшениці (А) та питома швидкість їхнього росту (Б);

довжина коренів проростків гороху (В) та питома швидкість їхнього росту (Г) в контрольному варіанті (1) і після передпосівної обробки: (2) обробка перманганатом калію; (3) етиловим спиртом (30 сек.) та гіпохлоритом натрію (30 хв.); (4) етиловий спирт (5 хв.) і гіпохлорит натрію (40 хв.)

* - $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем

Найбільший ефект стимуляції як абсолютної (довжина кореня), так і питомої швидкості росту коренів пшениці спостерігали після 3-го способу передпосівної обробки насіння пшениці (рис. 2А, Б). Так, за абсолютною швидкістю росту на 3 добу вони перевершували контроль на 40 %, а за питомою швидкістю росту – на 36 % на 2 добу та на 98 % на 3 добу в порівнянні з контролем. Необхідно відзначити, що в контролі, після 1-го і після 2-го способів передпосівної обробки насіння питома швидкість росту на 3 добу зменшувалася в порівнянні з 2 добою, а після 3-го способу обробки вона залишалася такою ж, як і на 2 добу росту (рис. 2В).

У тому випадку, якщо насіння гороху обробляли передпосівною обробкою, то 1-й та 2-й способи передпосівної обробки насіння не впливали на інтенсивність росту коренів, в той час як 3-й спосіб обробки прискорював їх ріст (рис. 1В, Г). Так, довжина коренів була вище контрольного варіанту на 106, 99 та 103 % на 1, 2, та 3 добу, відповідно (рис. 2В). Питома швидкість росту також була значно вищою за контрольних значень (рис. 2 Г).

Такий характер нелінійної динаміки росту проростків і висока варіабельність одержаних результатів в біологічних експериментах відображає той факт, що біологічні системи - це нелінійні динамічні системи, для яких характерна

«хаотичність» поведінки. Для характеристик таких систем аналізують динаміку поведінки системи в фазовому просторі. Графічне зображення поведінки системи в фазовому просторі отримало назву «атракторів». Площа атракторів (траєкторія динаміки росту коренів пшениці) в контрольному варіанті з 1 по 3 добу росту збільшувалася з 1 по 2 добу в 7 разів і в 3,5 рази з 2 по 3 добу росту (рис. 2А).

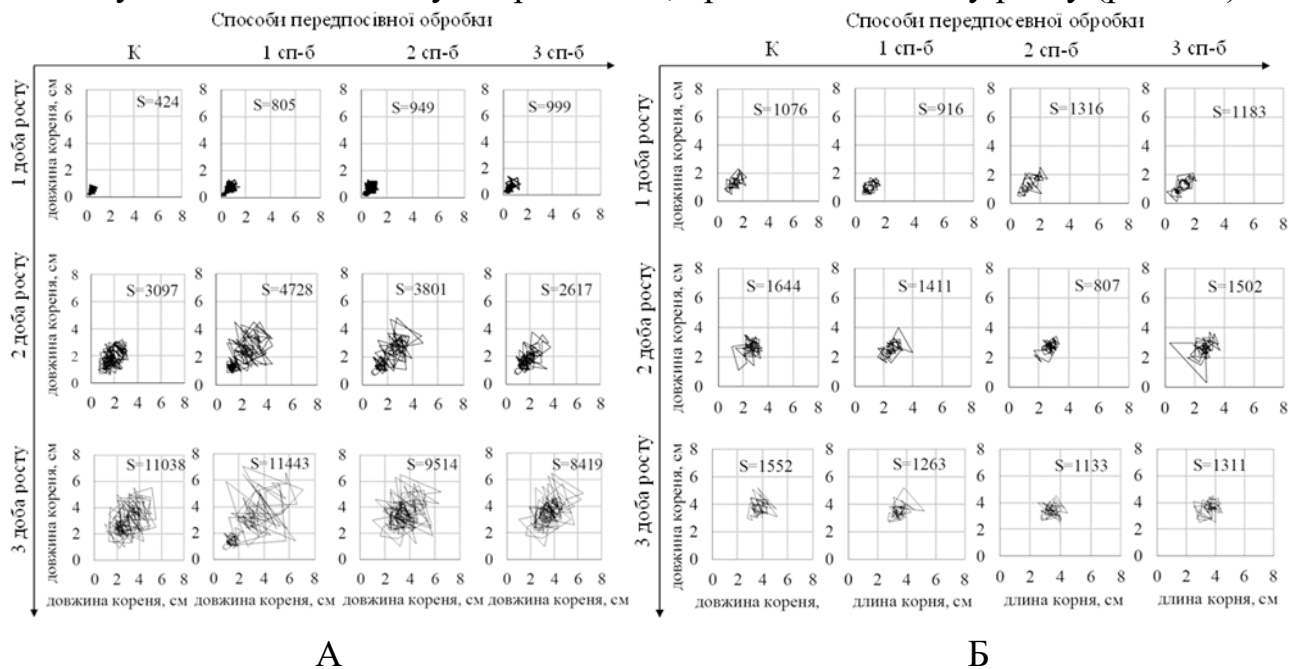


Рис. 2 Атрактори для довжини коренів проростків пшениці (А) і гороху (Б) з 1 по 3 добу росту. Зерна пшениці обробляли різними способами: К - контрольний варіант, 1 сп-б передпосівної обробки - перманганат калію, 2 сп-б - етиловий спирт (30 сек.) і гіпохлорит натрію (30 хв.); 3 сп-б - етиловий спирт (5 хв.) і гіпохлорит натрію (40 хв.)

Після передпосівної обробки насіння пшениці площа «дивного атрактора» у 1 добових проростків була в 2 рази в порівнянні з контролем незалежно від способу передпосівної обробки (рис. 2А). Однак, на 2 та 3 добу вони достовірно не відрізнялися від контролю (рис. 2А). Отже, варіабельність динаміки росту коренів пшениці збільшувалася з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння пшениці збільшувала варіабельність динаміки росту тільки у 1 добових корей пшениці і це не залежало від способу передпосівної обробки.

«Дивні аттрактори» для динаміки росту коренів гороху сильно відрізнялися від «дивних атракторів» пшениці (рис. 2Б). Так, для 1-добових коренів гороху площа «дивного атрактора» була в 2 рази більше ніж у пшениці. Площа атрактора достовірно не змінювалася з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння гороху не впливала на площу «дивних атракторів» на 2 та 3 добу росту (рис. 2Б).

Отже, використання «дивних атракторів» дозволяє виявити видові відмінності нелінійної динаміки змін показників росту коренів і можуть бути використані при оцінці варіабельності біологічних показників.

Така варіабельність динаміки росту коренів може бути обумовлена різною схожістю насіння. Насіння пшениці контрольного варіанту були досить гетерогенні за швидкістю проростання. Це проявлялося в лінійному зменшенні кількості

непророслого насіння з 1 по 3 добу. Якщо насіння пшениці обробляли 1-м способом передпосівної обробки, то кількість непророслого насіння не відрізнялася від контрольного варіанту. Якщо насіння пшениці обробляли 2-м способом, то кількість непророслого насіння до кінця першої доби становило 36 %, а до 3 діб – 15 % проти 6 % в контролі. 3-й спосіб обробки насіння збільшував схожість насіння пшениці. Схожість насіння гороху в контрольному варіанті була значно краще в порівнянні з пшеницею. 3-й спосіб передпосівної обробки прискорював схожість насіння гороху на 4 % на 1 добу в порівнянні з контролем.

Отже, однотипна передпосівна обробка насіння гороху і пшениці по-різному впливала на схожість насіння і, як наслідок, на ріст проростків.

Якісний та кількісний склад кореневих екзометаболітів після різних способів передпосівної обробки насіння пшениці та гороху. Відомо, що в складі кореневих екзометаболітів присутні різноманітні біологічно активні сполуки (Kamath R. et al., 2004; Cai Z. et al., 2011; Zhang Y. et al., 2014), велика частина їх припадає на білки і вуглеводи (Meyer S. et al., 2010; Bozhkov A. I. et al., 2013; Rohrbacher F. et al., 2016). Вміст білка, вільних амінокислот та вуглеводів в екзометаболітах пшениці збільшувався з 1 по 3 добу, а у КЕМ гороху він не змінювався або змінювався незначно (рис. 3, 4). Про відмінність динамки екскреторної активності коренів пшениці та гороху свідчить те, що вміст білка в складі 1-добових екзометаболітів гороху був у 14 разів більше, ніж у пшениці, а на 3 добу – тільки в 3,9 рази більше в порівнянні з такими пшениці в контрольному варіанті (рис. 3, 4).

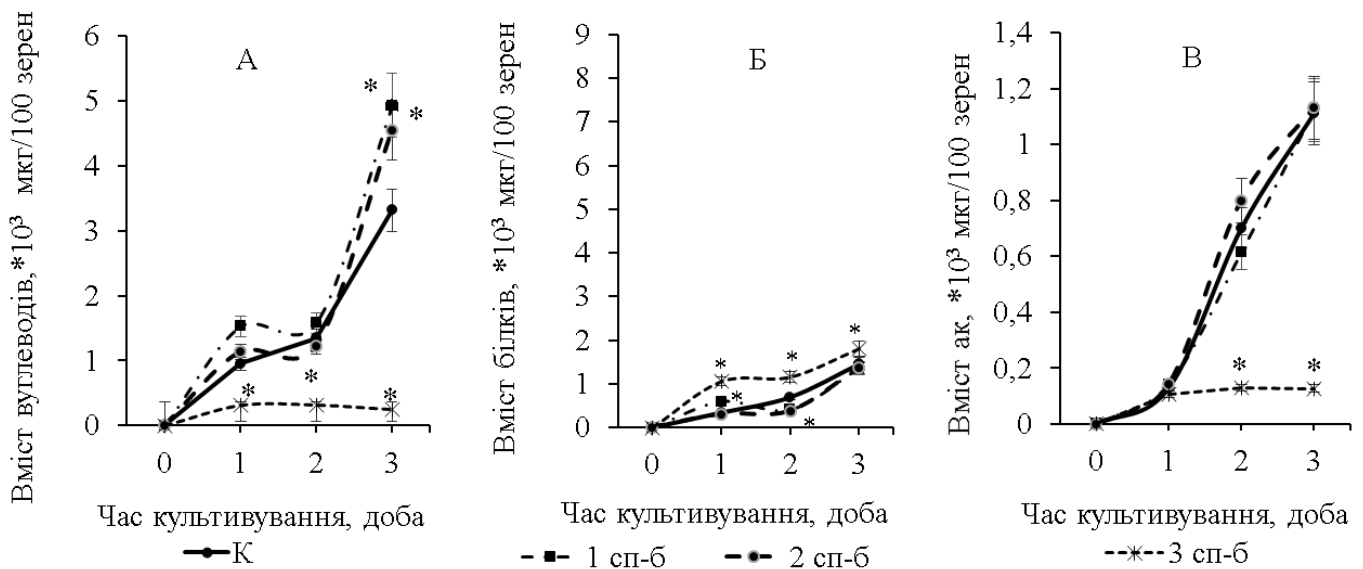


Рис. 3 Вміст вуглеводів (А), загальних білків (Б), вільних амінокислот (С) у складі кореневих екзометаболітів проростків пшениці з 1 по 3 добу росту при різних передпосівної обробки; * - $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

Вміст вуглеводів на 1 добу росту коренів пшениці контрольного варіанту становило 950 мкг глюкози / 100 проростків (рис. 3). На 2 добу він збільшувався на 41 % в порівнянні з 1 добою, а за 3-ю добу кількість вуглеводів становило 3311 мкг глюкози / 100 зерен, що було на 146 % більше у порівнянні з контрольним варіантом

на 2 добу. Обробка насіння 1-м та 2-м способами приводила до збільшення вмісту вуглеводів у складі корневих екзометаболітів на 3 добу росту в порівнянні з контролем (рис. 3). Обробка насіння пшениці 3-м способом приводила до пригнічення екскреції вуглеводів (рис. 3). Вміст білка в складі корневих екзометаболітів проростків пшениці контрольного варіанту збільшувався з 1 по 3 добу культивування. Передпосівна обробка насіння перманганатом калію приводила до збільшення вмісту білка в складі екзометаболітів 1-добових проростків на 75 % у порівнянні з контролем, а у 2-добових проростків вміст білка було на 40 % менше в порівнянні з контрольним варіантом. Обробка насіння етиловим спиртом і гіпохлоритом натрію також приводило до зменшення вмісту білка у 2-добових проростків на 45 % в порівнянні з контролем. Обробка насіння пшениці 3-м способом приводила до збільшення вмісту білка в складі КЕМ з 1 по 3 добу росту в порівнянні з контролем (рис. 3). Передпосівна обробка насіння пшениці не впливала на вміст вільних амінокислот в складі корневих екзометаболітів з 1 по 3 добу росту при 1-му і 2-му способах передпосівної обробки насіння в порівнянні з контролем. Обробка насіння 3-м способом приводила до зменшення вмісту амінокислот у складі КЕМ в порівнянні з контролем, як і в випадку з вмістом вуглеводів.

При визначенні складу водних корневих екзометаболітів проростків гороху було виявлено, що вміст вуглеводів в складі КЕМ після 1-го та 2-го способів передпосівної обробки насіння не змінювався в порівнянні з контрольним варіантом (рис. 4). Незначно змінювався їх вміст після 3-го способу обробки.

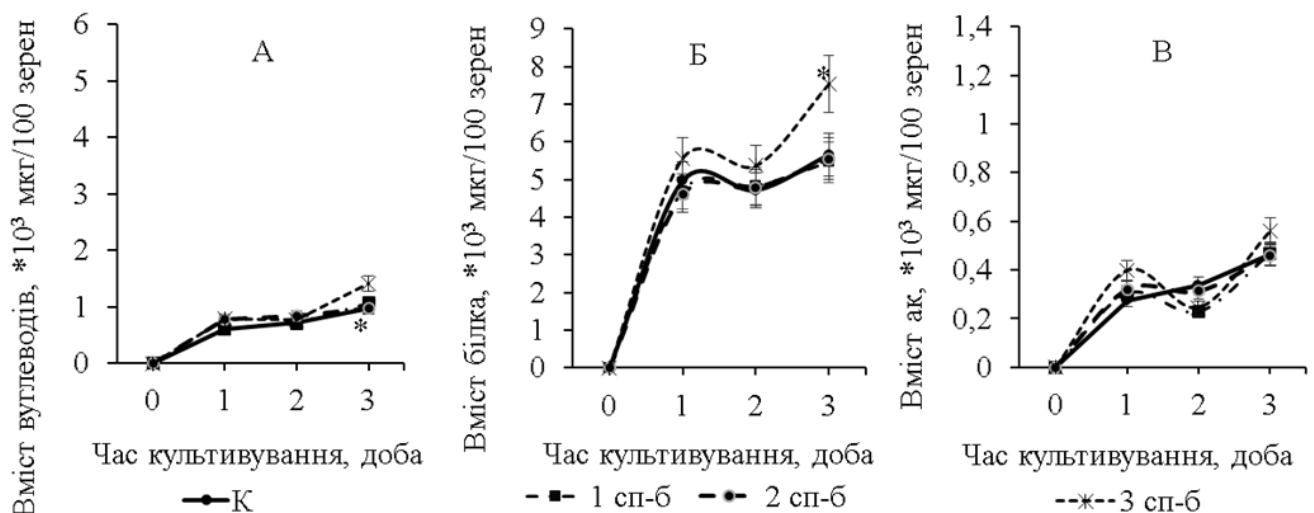


Рис. 4 Вміст загальних вуглеводів (А), білків (Б) і вільних амінокислот (В) у складі водних КЕМ проростків гороху з 1 по 3 добу росту після різних способів передпосівної обробки; * - $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

У складі водних екзометаболітів гороху вміст вуглеводів після 3 діби росту збільшувався на 43 % у порівнянні з контрольним варіантом (рис. 4). Вміст білка в складі КЕМ гороху залишався незмінним після передпосівної обробки насіння 1-м та 2-м способом (рис. 4). Однак, після обробки насіння 3-м способом вміст білка в складі корневих екзометаболітів збільшувався на 34 % на 3 добу відповідно в порівнянні з їх кількістю в контрольному варіанті (рис. 4).

Отже, передпосівна обробка насіння гороху 3-м способом супроводжувалася збільшенням швидкості росту проростків і збільшенням кількості білка в складі корневих екзометаболітів проростків.

Динаміка вмісту вільних амінокислот у складі корневих екзометаболітів була подібна до такого білка (рис. 4) з тією лише різницею, що після 3-го способу передпосівної обробки насіння їх кількість збільшувалася в порівнянні з контролем тільки на 21 %, а не на 33 % як для білка (рис. 4). Отже, збільшення швидкості росту коренів гороху в 2 рази на 3 дібу росту після 3-го способу передпосівної обробки супроводжувалася посиленням екскреторної активності корневих екзометаболітів у порівнянні з контролем.

Можна зробити висновок, що передпосівна обробка насіння гороху може бути використана для індукції екскреторної активності тільки після 3-го способу передпосівної обробки.

Отже, передпосівна обробка насіння мала різний вплив на інтенсивність екскреції корневих екзометаболітів та це залежало як від способів обробки, так і від видового складу рослин. Різні ефекти впливу передпосівної обробки на насіння пшениці та гороху можуть пояснюватися відмінностями в структурі насіння і особливостями метаболізму клітин пшениці та гороху, що проявлялося в тому, що велика частина корневих екзометаболітів пшениці представлені вуглеводами, а гороху – білками. Отже, використовуючи пшеницю і горох можна отримувати біологічно активні сполуки різного складу з різною біологічною активністю.

Як відомо, в характеристиці екскреторної активності кореня важливу роль відіграють прикордонні клітини кореня (Hawes M. C. et al., 1998; Bozhkov A. I. et al., 2007; Kuznetsova Y. A. et al., 2018). Визначення кількості прикордонних клітин в ризосфері коренів пшениці та гороху показало, що у 1 добових коренів пшениці було виявлено 80-100 прикордонних клітин на корінь, в той час як у гороху їх кількість може варіювати від тисячі до кількох тисяч (рис. 5А). Необхідно відзначити, що прикордонні клітини кореня пшениці і гороху розрізнялися за розмірами і формою клітин (рис. 5Б).

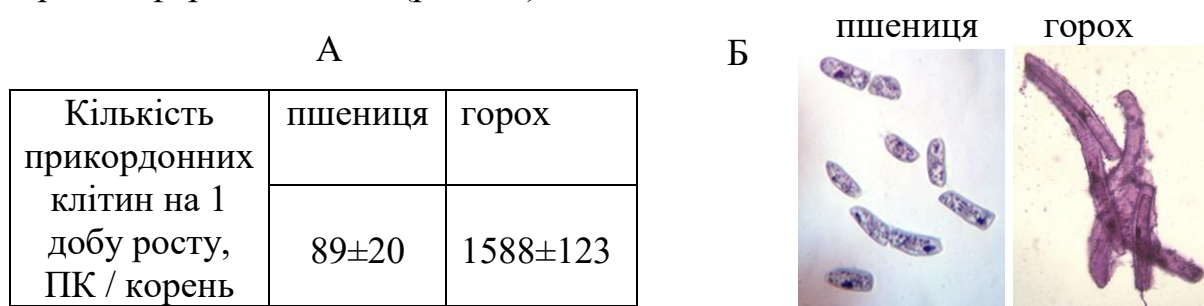


Рис. 5 Кількість прикордонних клітин (А) в ризосфері 1-добових коренів пшениці та гороху, морфологічні особливості цих клітин (Б). Збільшення в 100 разів

Таким чином, передпосівна обробка насіння пшениці та гороху мала стимулюючу дію на інтенсивність росту проростків, яка залежала від видового складу рослин і способу обробки. Стимуляція росту такими неспецифічними для рослин речовинами як гіпохлорит натрію, етиловий спирт, які мають токсичний ефект, дозволяє вважати, що мала місце неспецифічна відповідь (гормезис). Ефект

стимуляції передпосівної обробки насіння може пояснити тим, що гіпохлорит натрію і етиловий спирт в концентраціях і тимчасових інтервалах, які були використані, надає незначні пошкодження поверхні насіння і, можливо, клітин зародка, що прискорює швидкість надходження води в тканини і збільшує активність клітин як відповідь на незначні пошкодження клітинних компонентів, що і викликає гормезисний ефект. Подібний гормезисний ефект був показан після опромінення різними видами радіації і дією інших фізичних факторів (Calabrese E. J. & Baldwin L. A., 1998; Flores F. J. & Garzon C. D. 2012).

Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на видовий склад епіфітних мікроорганізмів. Для визначення бактерій, що знаходяться на поверхні насіння пшениці та гороху в контролі і після різних способів передпосівної обробки, брали мазок з поверхні зернівки і отримували чисті колонії бактерій. Для визначення видового складу грамнегативних мікроорганізмів, отриманих з поверхні пшениці та гороху, використовували тест (API) (рис. 6).



Pantoea agglomerans

Pseudomonas fluorescens
або *Pseudomonas putida*

Klebsiella pneumoniae
або *Raoultella terrigena*

Рис. 6 Тест API. Результати хімічних реакцій

Для контрольного насіння пшениці тест API показав відповідність бактерій до *Pantoea agglomerans* і *Pseudomonas fluorescens* або *Pseudomonas putida*. На поверхні контрольних насіння гороху в тесті API дали позитивні реакції *Klebsiella pneumoniae* і *Raoultella terrigena* (рис. 6). Для уточнення видового складу епіфітних мікроорганізмів виділяли ДНК мікроорганізмів, проводили гель електрофорез, ПЛР та визначали розмір отриманих фрагментів генів 16S р РНК. Гени 16S р РНК у всіх отриманих мікроорганізмів мали 1250 пар основ (рис. 7).

У результаті секвенування і порівняльного аналізу за допомогою програм (BLAST) виявили відповідності для бактерій. Було виявлено, що епіфітні мікроорганізми насіння пшениці після промивання проточною і стерильною дистильованою водою були представлені 2 основними видами бактерій (*Pantoea agglomerans* і *Pseudomonas fluorescens*), а насіння гороху – чотирма основними видами (*Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus pasteurii*), два з яких є патогенними для людини і тварин (табл. 1).

Було виявлено, що передпосівна обробка насіння пшениці перманганатом калію не впливала на видовий склад бактерій, які присутні на поверхні зернівки пшениці. Однак, 2-й спосіб обробки насіння пшениці (етиловий спирт і гіпохлорит натрію) видаляв обидва види бактерій, про що свідчить відсутність росту бактерій на універсальному живильному середовищі (табл. 1).

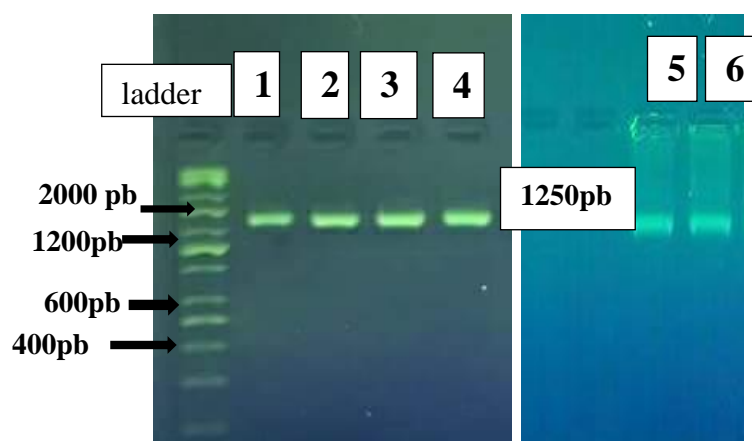


Рис. 7 Продукт ПЛР - розмір гена рРНК, що складається з 1250 пар основ (pb). Поділ проводили в 2 % агарозі при 5 вольт / см². 1х ТВЕ буфер на 1:30 годин. N: маркери фрагментів ДНК (100 мкл). 1, 2, 3, 4 зразки ДНК, виділених з колоній бактерій, отриманих з поверхні насіння гороху. 5, 6 - зразки бактерій з поверхні насіння пшениці

Таблиця 1

Присутність бактерій на поверхні насіння гороху і пшениці після різних способів передпосівної обробки

	Род бактерій		
	контроль (проточна вода)	1 спосіб обробки (перманганат калію)	2 спосіб обробки (етилловий спирт, гіпохлорит натрію)
Пшениця	<i>Pantoea agglomerans</i> strain C410P1.	<i>Pantoea agglomerans</i> strain C410P1.	Не було бактерій, які росли на МПА 
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain SBW25.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain SBW25	
Горох	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain VB-1.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain VB-1.5	-
	<i>Bacillus safensis</i> strain 18.	<i>Bacillus safensis</i> strain 18.	<i>Bacillus safensis</i> strain 18.
	<i>Bacillus pumilus</i> strain G006.	<i>Bacillus pumilus</i> strain G006	<i>Bacillus pumilus</i> strain G006
	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain SMJ3	-	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain SMJ33

Після обробки насіння гороху перманганатом калію з поверхні насіння віддалялися *Staphylococcus pasteurii* і виявили тільки 3 види бактерій (табл. 1). Передпосівна обробка насіння гороху етиловим спиртом і гіпохлоритом натрію приводила до видалення тільки *Klebsiella pneumoniae* (табл. 1).

Отже, передпосівна обробка насіння пшениці та гороху однотипними способами забезпечувала різну ефективність знезараження насіння та може бути використана при отриманні корневих екзометаболітів (рис. 8).

Необхідно відмітити, що видалення мікроорганізмів з поверхні насіння пшениці супроводжувалося невеликим ефектом пригнічення схожості насіння, при цьому питома швидкість росту насіння, яке залишилося, перевищувала контрольний варіант на 32 % на 2-3 добу росту. Можливо це пов'язано з тим, що частина насіння

втрачала схожість після обробки, по-друге, для насіння, яке зберегло схожість, проявлявся гормезісний ефект - стимулюючий ефект малими дозами токсикантів.



Рис. 8 Етапи отримання корневих екзометаболітів та проростків пшениці і гороху після видалення епіфітних мікроорганізмів, що виявляють патогенні властивості

Важливо відзначити, що передпосівна обробка насіння пшениці не пригнічувала, а навіть збільшувала інтенсивність екскреції корневих екзометаболітів пшениці на 17-21 % на 3 добу культивування в порівнянні з контрольним варіантом. Обробка насіння пшениці перманганатом калію, яка не забезпечувала видалення епіфітних мікроорганізмів і в меншій мірі стимулювала рост проростків, також мала стимулюючий ефект на екскреторну активність кореня. На користь висловлених положень можуть свідчити і результати, отримані на насінні гороху. Так, така ж передпосівна обробка насіння гороху не забезпечувала видалення всіх мікроорганізмів з поверхні насіння, не впливала на схожість насіння та інтенсивність росту проростків, при цьому екскреторна активність коренів залишалася на рівні контролю.

Разом з тим, два різні способи передпосівної обробки насіння гороху дозволяють видалити патогенні штами бактерій (*Klebsiella*, *Staphylococcus*). Така вибірковість пояснюється різною чутливістю *Klebsiella* і *Staphylococcus* до перманганату калію, спирту та гіпохлориту натрію.

Відзначимо, що передпосівна обробка насіння пшениці послідовною обробкою етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію може бути рекомендована при отриманні корневих екзометаболітів пшениці (рис. 8), а послідовна обробка гороху рекомендована для видалення патогенних мікроорганізмів.

Оцінка біологічної активності корневих екзометаболітів. На першому етапі визначали вплив корневих екзометаболітів гороху на інтенсивність росту коренів пшениці і навпаки, екзометаболітів пшениці на ріст коренів гороху. Для цього зерна пшениці та гороху обробляли контрольним, 1-м та 2-м способами передпосівної обробки. Внесення корневих екзометаболітів гороху, отриманих у 1 добових коренів, в культуру 1 добових проростків пшениці прискорювали рост коренів пшениці на 31 % в порівнянні з контролем, а через 3 доби навіть на 58 % (рис. 9). Внесення екзометаболітів пшениці, отриманих у 1 добових коренів пшениці до 1 добових проростків гороху, також мало стимулюючий ефект на ріст коренів, проте він був виражений в меншій мірі, ніж вплив екзометаболітів гороху на корені пшениці (рис. 9).

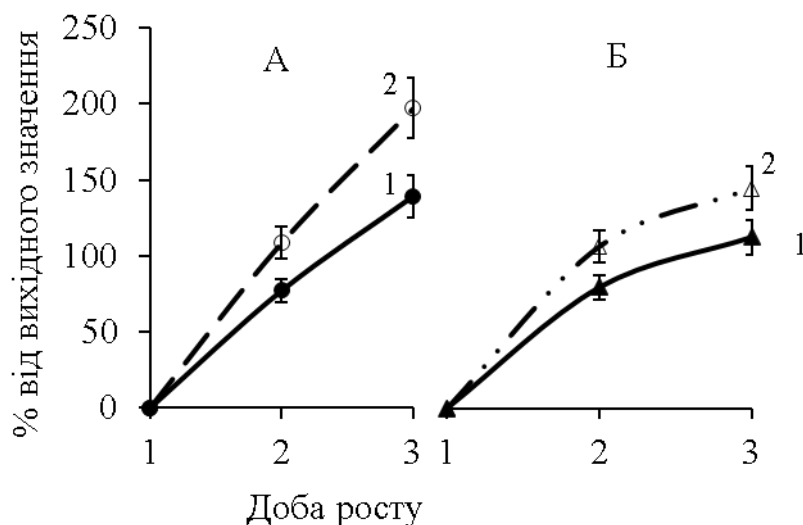


Рис. 9 Вплив корневих екзометаболітів гороху (1-добові) на ріст коренів пшениці (А) і корневих екзометаболітів пшениці (1-добових) на ріст коренів гороху (Б). Довжина коренів показана у відсотках від вихідного значення, до внесення КЕМ. 1 - контроль без внесення КЕМ; 2 - після внесення КЕМ

Використання КЕМ в якості поживних середовищ для культивування мікроорганізмів. Далі в роботі використовували 2-добові водні КЕМ пшениці і гороху для культивування різних культур бактерій. Ріст ґрунтових мікроорганізмів роду *Bacillus* на поживних середовищах на основі КЕМ залежав від виду мікроорганізмів. Було виявлено, що клітини *Bacillus cereus* на універсальному середовищі МПА утворювали добре виражені округлі колонії білого кольору. Площа колоній становила 2643,7 ум. од. (рис. 10А). У тому випадку, якщо *Bacillus cereus* культивували на КЕМ пшениці, ріст бактерій був відсутній, тобто вони не здатні засвоювати екзометаболіти пшениці (рис. 10А). Якщо *Bacillus cereus* культивували на середовищі з КЕМ гороху, то бактерії утворювали такі ж білі, округлі колонії, як і на МПА (рис. 10А). Ці результати підтверджують відмінність складу корневих екзометаболітів пшениці та гороху і вказують, що кореневі екзометаболіти можна використовувати як селективні середовища для мікроорганізмів.

Для оцінки інтенсивності росту бактеріальної культури визначали площу колоній. Виявили, що площа колоній *Bacillus cereus* не залежить від способу передпосівної обробки насіння і була на 70-80 % менше площі колоній мікроорганізмів при рості на МПА.

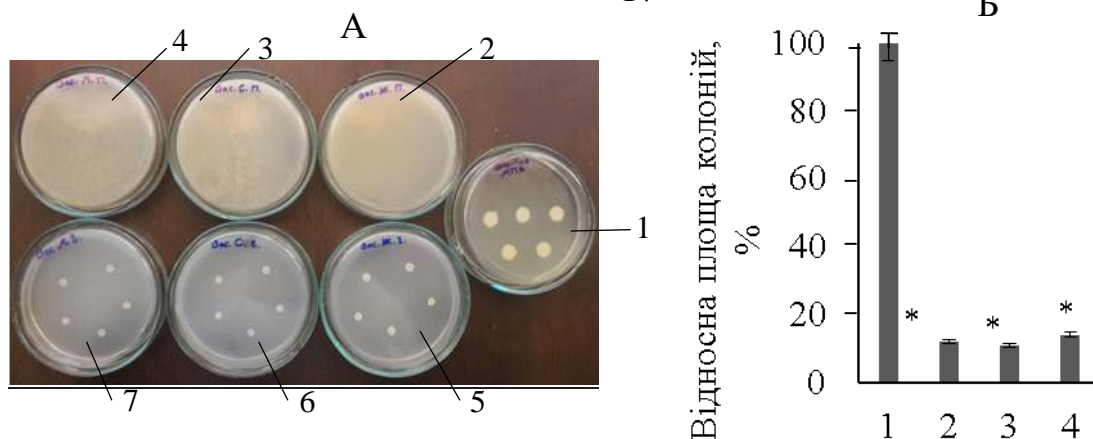


Рис. 10 Ріст *Bacillus cereus* на живильних середовищах (А), що містять м'ясо-пептонний агар (1), кореневі екзометаболіти пшениці (2, 3, 4), отримані у 2-добових коренів і кореневі екзометаболіти гороху (5, 6, 7), отримані у 2 добових коренів. Відносна площа колоній *Bacillus cer.* (Б) відповідно на МПА (1), на КЕМ гороху, отриманих без передпосівної обробки (2), після 1-го способу обробки (3) і після 2-го способу передпосівної обробки (4); * - $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

Бактерії *Bacillus licheniformis* росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці і гороху. При цьому колонії *Bacillus licheniformis* на чашках Петрі з КЕМ пшениці були виявлені тільки на 24 години росту, а на КЕМ гороху - на 48 годину росту. Бактерії *Bacillus popilliae* росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці і гороху.

Було виявлено, що КЕМ пшениці і гороху в порівнянні з МПА інгібували рост бактерій *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* і *Klebsiella pneumoniae*. Так, бактерії *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli* не росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці і гороху. Бактерії *Klebsiella pneumoniae* росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці і не росли на чашках Петрі, що містять КЕМ гороху. Слід зазначити, що площа колоній *Klebsiella pneumoniae* на МПА була більша за площу їх колоній, що ростуть на КЕМ пшениці.

Відсутність або інгібування росту цих бактерій на живильних середовищах на основі КЕМ пшениці або гороху може бути пов'язана з: 1) нездатністю цих бактерій поглинати речовини, що містяться в КЕМ пшениці та гороху; 2) відсутністю або малою кількістю речовин в КЕМ, необхідною для росту бактерій; 3) наявністю в КЕМ речовин, що пригнічують ріст цих бактерій.

Внесення в культуру 1-добових проростків пшениці або гороху рідких культур мікроорганізмів *Bacillus cereus* і *Bacillus popilliae* по-різному впливало на ріст проростків. Коріння пшениці мали більшу чутливість до негативного впливу *Bacillus cereus* та *Bacillus popilliae*.

Антиоксидантна та антирадикальна активність корневих екзометаболітів проростків пшениці в системі *in vitro*. Тестування антиоксидантної активності водних КЕМ пшениці проводили на модельних системах *in vitro*. Виявилося, що близько 50 % ОН-радикалів утворюються в системі перехоплювалися молекулами спирту (рис. 11). У тому випадку, якщо в тест-систему вносили такий же обсяг води, то інтенсивність перехоплення ОН-радикалів була відсутня.

Антиоксидантна активність та активність перехвату ОН-радикалів, %

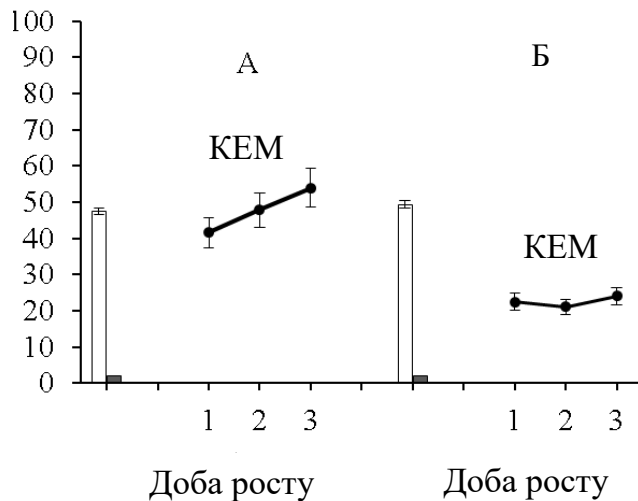


Рис. 11 Інтенсивність перехоплення гідроксильних радикалів (А) і антиоксидантна активність (Б) КЕМ 1, 2 і 3-добових проростків пшениці в системі *in vitro*, виражена у відсотках. На гістограмах показана відповідна активність етилового спирту (5 мг/мл) (А, □), α-токоферолу (7 мкг/мл) (Б, □) і фізіологічного розчину (відсутність активності).

При внесенні в систему КЕМ 1-денних проростків пшениці відбувалося перехоплення понад 40 % вільних радикалів, у 2-добових проростків цей показник достовірно не відрізнявся від 1-добових, а у 3-добових він незначно збільшувався (рис. 11А). Отже, КЕМ 1-3-добових проростків мали виражену здатність до перехоплення вільних радикалів в системі *in vitro*, яка не поступалася прийнятому стандарту - етиловому спирту.

При визначенні антиоксидантної активності в системі *in vitro* прийнято використовувати в якості стандарту α-токоферол. Виявилось, що токоферол мав виражену антиоксидантну активність, яка була відсутня у води (рис. 11Б). КЕМ 1-3-добових проростків пшениці мали виражену антиоксидантну активність, яка була лише на 25 % менше токоферолу (рис. 11Б). Антиоксидантна активність не розрізнялася у 1, 2 та 3-добових проростків. Отже, КЕМ 1-3-добових проростків пшениці проявляли виражену антиоксидантну активність і в системі *in vitro*.

Вплив КЕМ проростків пшениці на регенерацію печінки щурів після часткової гепатектомії. Як відомо, часткова гепатектомії індукує регенерацію печінки за рахунок проліферації клітин (посилення синтезу ДНК і РНК) (Sigal S. H. et. al., 1999) Так, в нашому дослідженні швидкість синтезу ДНК після часткової гепатектомії збільшувалася в 2,7 раз, а РНК - в 1,6 рази в порівнянні з інтактним контрольним рівнем (рис. 12).

У тому випадку, коли тваринам через годину після операції часткової гепатектомії вводили КЕМ, а через 24 години визначали питому радіоактивність ДНК, вона була вище контролю (часткова гепатектомії без КЕМ) в 7 разів при дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Збільшення дози КЕМ до 0,5 мг / 100 г маси тіла приводило до прискорення синтезу ДНК тільки в 8 разів у порівнянні з контролем, а подальше збільшення дози до 1,0 мг / 100 г маси тіла знижувало ефект стимуляції синтезу ДНК, хоча він був ще добре виражений (рис. 12). Отже, внутрішньоочеревинне введення тваринам корених екзометаболітів пшениці викликало дозозалежне збільшення швидкості синтезу ДНК.

Введення КЕМ тваринам після часткової гепатектомії в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла збільшувало швидкість синтезу і РНК в 3 рази в порівнянні з контрольною групою, а при введенні КЕМ в дозі 0,5 мг / 100 г маси тіла швидкість синтезу РНК збільшувалася в 4,5 рази в порівнянні з контролем. Велика доза КЕМ (1,0 мг / 100 г

маси тіла), як і в випадку з ДНК, надавала менший ефект. Отже, КЕМ в досліджуваних дозах надавав дозозалежний ефект як на швидкість синтезу ДНК, так і РНК після часткової гепатектомії.

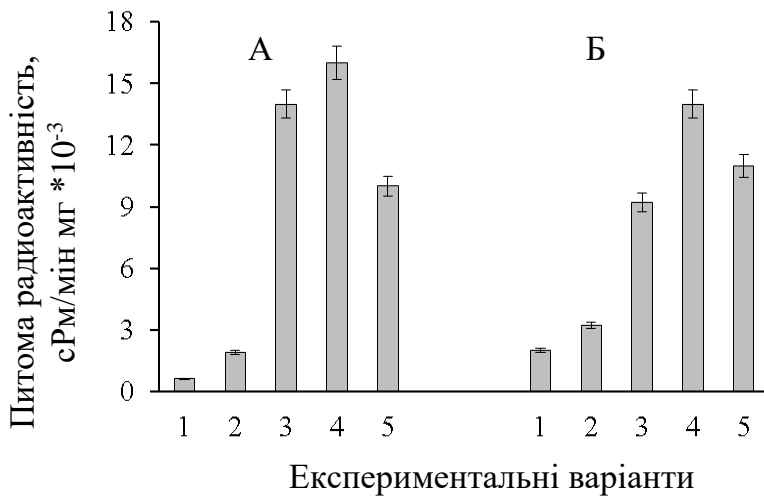


Рис. 12. Питома радіоактивність ДНК (А) і РНК (Б) клітинних ядер печінки щурів. Варіанти експерименту: 1 - інтактная печінку; 2 - печінка через 22 години після часткової гепатектомії; 3-5 - варіант 2 + введення КЕМ в дозі 0,1; 0,5 і 1,0 мг / 100 г маси тіла

Таким чином, КЕМ пшениці та гороху: різні за складом, їхній склад можна регулювати передпосівною обробкою насіння; передпосівна обробка насіння видаляє певні епіфітні мікроорганізми, які можуть впливати на екскрецію коренів; КЕМ пшениці та гороху мають різну біологічну активність, завдяки чому їх можна використовувати в різних галузях біотехнології.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі показано, що при культивуванні проростків пшениці й гороху в водній культурі при температурі 24-26 °С, при постійному освітленні у водне середовище на 1 добу росту корені гороху екскретують 5,8 мкг / 100 зерен, а корені пшениці – 1,42 мкг / 100 зерен. Передпосівна обробка насіння пшениці й гороху впливає на кількісний, якісний склад кореневих екзометаболітів та на склад епіфітної мікрофлори насіння пшениці та гороху. КЕМ мають різну біологічну активність, що може бути використано в кореневих біотехнологіях при отриманні біологічноактивних сполук.

1. Передпосівна обробка насіння пшениці (етилловим спиртом та гіпохлоритом натрія – 2 і 3 способи) на 3 добу росту прискорювала рост коренів проростків пшениці на 25 % і 40 % відповідно, а рост коренів гороху (3 спосіб) – около 100 %.

2. Кількість кореневих екзометаболітів пшениці майже лінійно збільшувалася з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння пшениці (перманганатом калія; етиловим спиртом та гіпохлоридом натрія – 2 спосіб) супроводжувалася збільшенням кількості кореневих екзометаболітів на 25 % і 20 % відповідно на 3 добу росту.

3. Кількість кореневих екзометаболітів гороху в контрольному варіанті вже на 1 добу росту проростків становило 5832 мкг / 100 зерен, що в 4 рази більше в порівнянні з пшеницею. Кількість кореневих екзометаболітів гороху залишалося незмінним з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння гороху 3-м способом збільшувала вміст кореневих екзометаболітів на 42 % на 3 дібу росту в порівнянні з 1 добою росту.

4. Кореневі екзометаболіти пшениці контрольного варіанту представлені на 67 % вуглеводами, на 25 % білками, а на вільні амінокислоти – 8 %. У той же час екзометаболіти гороху були представлені в основному білками – 85 %, на вуглеводи і вільні амінокислоти доводилося 10 % та 5 % відповідно.

5. У ризосфері коренів пшениці («закрита» меристема) контрольного варіанту виявили близько сотні прикордонних клітин, а в ризосфері коренів гороху («відкрита» меристема) - понад тисячу.

6. На насінні пшениці присутні епіфітні мікроорганізми – *Pantoe agglomerans* і *Pseudomonas fluorescens*, які інактивуються передпосівної обробкою насіння (2-м способом). На насінні гороху присутні *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus pasteurii*, з яких можуть бути інактивовані *Staphylococcus pasteurii*, *Klebsiella pneumoniae* послідовною обробкою насіння гороху перманганатом калію, етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію.

7. Перехресне внесення корневих екзометаболітів до проростків пшениці і гороху мало різний стимулюючий ефект на рост проростків. Так, кореневі екзометаболіти гороху стимулювали рост проростків пшениці в водній культурі на 58 % на 3 дібу росту, якщо їх вносили на 1 добу росту після проростання. Внесення в водну культуру гороху корневих екзометаболітів пшениці прискорювало ріст проростків гороху на 34 %. Кореневі екзометаболіти пшениці мали виражену антиоксидантну активність і прискорювали активність клітин печінки після часткової гепатектомії у щурів.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікація в науковому фаховому виданні України, що входить до міжнародної наукометричної бази Web of Science:

1. Bozhkov A. I., Kovalova M. K., **Azeev Z. A.**, Goltvjansky A. V. The effect of pre-sowing seed treatment on seedlings growth rate and their excretory activity // Regulatory mechanism in biosystem. 2020. Vol. 11, No. 1. P. 60 – 66. (Web of Science). (*Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, отримання корневих екзометаболітів, участь у написання статті*).

Публікації в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS:

2. Kuznetsova Yu. A., Bozhkov A. I., Menzyanova N. G., Goltvyansky A. V., **Azeev Zaid Ali** Root exudates of wheat seedlings express antibacterial and antioxidant activity and stimulate proliferation of liver cells // Indian Journal of Natural Products and Resources. 2018. Vol. 9(4). P. 303 – 310. (SCOPUS). (*Особистий внесок здобувача: отримання корневих екзометаболітів проростків пшениці, участь у написанні статті та переклад тексту на англійську мову*).

3. Kovalova Marina Konstantinovna, **Azeev Zaid Ali**, Bozhkov Anatoliy Ivanovich and Kuznetsova Yuliya Aleksandrovna Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds // Plant Archives. 2020. Vol. 20, Supplement 1. P. 3041 –

3049. (Konstantinovna K. M., Ali A. Z., Ivanovich B. A., Aleksandrovna K. Y. Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds // 2020. Vol. 20, P. 3041-3049. (SCOPUS). *(Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, отримання кореневих екзометаболітів, участь у написанні статті).*

Публікації в зарубіжних спеціалізованих виданнях:

4. **Azeez Zaid**, Kovalova M., Bozhkov A. Effects of pre-sowing seed treatment on the growth rate of seedlings and the activity of the excretory system of the wheat root in aquatic culture // International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 2018. Vol. 11(3). P. 573 – 583. *(Особистий внесок здобувача: обробка насіння гороху різними способами, культивування проростків гороху у проточному режимі, збір кореневих екзометаболітів, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, участь у написанні статті та переклад тексту на англійську мову).*

5. **Azeez Z. A.**, Bozhkov A. I., Mahmood M. T., Kovalova M. K. The species composition of epiphytic microorganisms and their influence on roots excretory activity of wheat and pea seedlings // Biochem. Cell. Arch. 2019. Vol. 19, No. 2. P. 3809 – 3818. *(Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, визначення мікроорганізмів, які знаходилися на поверхні зерен, проведення мікроскопічних, біохімічних тестів, участь у написанні статті).*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

6. **Azeez Z. A.**, Chumbash K. V. The influence of different methods of pre-sowing seeds process on root growth and on the microbes's composition of wheat seedling // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances : XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених, 18 – 21 квітня 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 8. *(Особистий внесок здобувача: визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, збір 2-добових кореневих екзометаболітів проростків пшениці, культивування їх на МПА, написання тез).*

7. **Azeez Z. A.** Multiple diagnosis of bacteria that live on the surface of wheat seeds // Біотехнологія: Звершення та Надії : VI науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 120-річчю НУБіП України, 14 – 16 листопада 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 270.

8. **Azeez Z.**, Kovalova M. The characteristics of the excretory system of wheat roots in the early stages of growth (1 st – 3 rd day) // Молодь і поступ біології : XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 185 річчю від дня народження Б. Дибовського, 10 – 12 квітня 2018 р.: тези доп. Львів, 2018. С. 127 – 128. *(Особистий внесок здобувача: обробка зерен пшениці та гороху різними способами, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, збір кореневих екзометаболітів, участь у написанні тез).*

9. Ковальова М. К., Азіз З. А. Вплив передпосівної обробки насіння гороху на склад водних кореневих екзометаболітів // Мікробіологія в сучасному

сільськогосподарському виробництві : матеріали XIII наукової конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня заснування Національної академії аграрних наук України, 24 – 25 жовтня 2018 р. Чернігів, 2018. С. 160 – 162. (*Особистий внесок здобувача: обробка зерен гороху різними способами, збір корневих екзометаболітів проростків гороху з 1 по 3 добу росту, участь у написанні тез*).

10. **Azeez Z. A.**, Kovalova M. K., JEBUR A. M. The removal of pathogenic microorganisms from the surface of pea grain depends on the method of treating seeds // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7 – 8 листопада 2018 р. Вінниця, 2018. С. 133 – 134. (*Особистий внесок здобувача: обробка зерен гороху різними способами, проведення мікроскопічних тестів, культивування мікроорганізмів на різному середовищі, проведення тесту API, участь у проведенні молекулярних тестів, участь у написанні тез*).

11. **Azeez Z. A.**, Kovalova M. K., Mahmood M. T. The use of root exudates as a nutrient medium for some types of bacteria // Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського: матеріали науково-практичної конференції, 12 лютого 2020 р. Харків, 2020. С. 59 – 60. (*Особистий внесок здобувача: отримання корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху, культивування мікроорганізмів на твердому середовищі, яке виготовлено на основі корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху, участь у написанні тез*).

АНОТАЦІЯ

ЗАІД АЛІ АЗІЗ Вплив передпосівної обробки насіння на мікробіоту ризосфери та екскреторну активність проростків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2020.

Дисертацію присвячено дослідженню впливу передпосівної обробки насіння на епіфіту мікробіоту, на якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів (КЕМ) проростків пшениці і гороху і їх біологічну активність. Передпосівна обробка насіння пшениці і гороху по-різному впливала на інтенсивність росту проростків та екскреторну активність коренів. Виявлено, що вміст білка, вільних амінокислот і вуглеводів в КЕМ пшениці збільшувалася з 1 по 3 добу, а у гороху він не змінювався. Способи передпосівної обробки насіння гороху не впливали на склад КЕМ, на відміну від пшениці. Кількість прикордонних клітин біля коріння пшениці було близько 100 клітин на корінь, а у гороху - близько 1500 і більше клітин. Виявлено, що на насінні пшениці присутні *Pantoea agglomerans* і *Pseudomonas fluorescens*, у гороху: *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus pasteurii*. Обробка насіння пшениці 2 способом приводила до видалення обох видів бактерій, а обробка насіння гороху 1 і 2 способами - до видалення *Staphylococcus pasteurii* і *Klebsiella pneumoniae*.

КЕМ пшениці і гороху можна використовувати в якості поживних середовищ

для культивування певних видів мікроорганізмів. Перехресне внесення КЕМ до проростків пшениці і гороху мало різний стимулюючий ефект на ріст проростків. КЕМ пшениці мали антирадикальну і антиоксидантну активність *in vitro*. Введення КЕМ пшениці тваринам *per os* через годину після часткової гепатектомії, приводило до збільшення питомої радіоактивності ДНК і РНК в клітинах печінки в порівнянні з контролем.

Ключові слова: передпосівної обробка, екскреторна активність, епіфітні мікроорганізми, пшениця, горох.

АННОТАЦИЯ

ЗАИД АЛИ АЗИЗ Влияние предпосевной обработки семян на микробиоту ризосферы и экскреторную активность проростков. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины, Киев, 2020.

Диссертация посвящена исследованию влияния предпосевной обработки семян на эпифитную микробиоту, качественный и количественный состав корневых экзометаболитов (КЕМ) проростков пшеницы и гороха и их биологическую активность. Предпосевная обработка семян пшеницы и гороха по-разному влияла на интенсивность роста проростков и экскреторную активность корней. Обнаружено, что содержание белка, свободных аминокислот и углеводов в КЕМ пшеницы увеличивалось с 1 по 3 сутки, а у гороха оно не изменялось. Способы предпосевной обработки семян гороха не оказывали влияние на состав КЕМ, в отличие от пшеницы. Количество пограничных клеток у корней пшеницы было около 100 клеток на корень, а у гороха – около 1500 и более клеток. Обнаружено, что на семенах пшеницы присутствуют *Pantoea agglomerans* и *Pseudomonas fluorescens*, у гороха: *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus pasteurii*. Обработка семян пшеницы 2 способом приводила к удалению обоих видов бактерий, а обработка семян гороха 1 и 2 способами – к удалению *Staphylococcus pasteurii* и *Klebsiella pneumoniae*.

КЕМ пшеницы и гороха можно использовать в качестве питательных сред для культивирования определенных видов микроорганизмов. Перекрестное внесение КЕМ к проросткам пшеницы и гороха оказывало разный стимулирующий эффект на рост проростков. КЕМ пшеницы обладали антирадикальной и антиоксидантной активностью *in vitro*. Введение КЕМ пшеницы животным *per os* через час после частичной гепатэктомии, приводило к увеличению удельной радиоактивности ДНК и РНК в клетках печени по сравнению с контролем.

Ключевые слова: предпосевная обработка, экскреторная активность, эпифитные микроорганизмы, пшеница, горох.

ABSTRACT

ZAID ALI AZEEZ The influence of pre-sowing seed treatment on the rhizosphere microbiota and excretory activity of seedlings. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological science in speciality 03.00.20–Biotechnology. – National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2020.

The aim of the work was to study the effect of pre-sowing seed treatment on epiphytic microbiota, qualitative and quantitative composition of root exometabolites of wheat and pea seedlings and their biological activity. In all experiments, different methods of pre-sowing treatment of wheat and pea seeds were used. The 2nd and 3rd methods of pre-sowing treatment of wheat seeds led to stimulation of root growth, but in peas, only the 3rd pre-sowing treatment method stimulated root growth. It was found that the content of protein, free amino acids and carbohydrates in exometabolites of wheat increased from 1 to 3 days, while in peas it did not change. seed treatment methods did not affect the composition of root exudates. Only the 3rd method of pre-sowing treatment of wheat seeds led to a decrease in carbohydrates and an increase in proteins in the composition of exudates, and led to a decrease in total root exudates, while in peas, to an increase only in the 3 day of growth. The number of border cells at the roots of wheat revealed about 100 cells per root, and in peas, their number was about 1500 or more cells. It was found that *Pantoea agglomerans* strain C410P1 and *Pseudomonas fluorescens* strain SBW25 were found on wheat seeds, but on pea seeds: *Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006, *Staphylococcus pasteurii* strain SMJ33. the second method of wheat treatment (ethyl alcohol and sodium hypochlorite) removed both types of bacteria. In the first method of peas treatment, *Staphylococcus pasteurii* was removed, while in the second method of treatment, *Klebsiella pneumoniae* was removed. The introduction of pea root exudates into the wheat seedlings culture accelerated wheat growth by 58 %. The introduction of wheat exudates accelerated the growth of peas, but not as pronounced as in wheat roots.

E. coli and *Staph. pasteurii* did not grow on the media of root exudates of wheat and pea. *Kl. pneumoniae* grew on wheat exudates. *B. licheniformis* and *B. popilliae* grew on the medium of root exudates of wheat and peas. The bacterium *B. cereus* grew on the root exudates of peas, and grew on the exudates of wheat. Moreover, these bacteria grew better on MPA than on root exudates. The introduction of liquid cultures of *B.s cereus* and *B. popilliae* in the culture of wheat or pea seedlings inhibited the growth of seedlings. It was found that the root exudates of wheat had a pronounced ability to intercept free radicals in the in vitro system, which was 40-60 %, which was not inferior to the accepted standard - ethyl alcohol. Also, root exudates of wheat had antioxidant activity, which was 25 % less than that of α -tocopherol. Also, the introduction of root exudates of animal wheat per os one hour after surgery led to an increase in the specific radioactivity of DNA and RNA in liver cells compared with the control.

Key words: pre-sowing treatment, excretory activity, epiphytic microorganism, wheat, peas.